製品コード CY209

食品・環境分析用

TaKaRa

Cycleave®PCR *Legionella* Detection Kit

説明書

v201308

レジオネラ属細菌は *Legionella pneumophila* に代表される好気性のグラム陰性桿菌で、土壌や淡水に生息し、冷却塔水、循環式浴槽水、温泉などの環境水を広く汚染します。汚染水のエアロゾル吸入や吸引経口感染など環境水を介したレジオネラ属菌の感染により、レジオネラ症と呼ばれる疾患が引き起こされます。現在、レジオネラ属菌は 70 菌種以上が知られており、その全ての菌種がレジオネラ症（レジオネラ肺炎）を引き起こす可能性がありますが、レジオネラ症の患者および環境水からの検出率が最も高いのは *Legionella pneumophila* です。現在、レジオネラ属菌の検査は培養法による検出が主流ですが、この方法では時間と手間がかかるため、迅速なレジオネラ検出法が求められています。CycleavePCR *Legionella* Detection Kit は、検出特異性の非常に高いサイクリングプローブ法を利用したリアルタイム PCR により、迅速にレジオネラ属細菌を検出するためのキットです。*L. pneumophila* の mip（macrophage infectivity potentiator protein）遺伝子特定配列をターゲットとする *L. pneumophila* の特異的検出、および 5S rRNA 遺伝子配列をターゲットとするレジオネラ属菌の広範囲な検出を、リアルタイム PCR 専用装置、Smart Cycler® System または Smart Cycler® II System＊を用いて行います。本キットには、mip 遺伝子検出用 FAM 標識プローブならびに 5S rRNA 遺伝子検出用 ROX 標識プローブが含まれています。また、インターナルコントロールとインターナルコントロール検出用 TET 標識プローブも含まれています。Smart Cycler® System/Smart Cycler® II System で 3 波長同時にモニタリングすることで、1 本のチューブで mip 遺伝子と 5S rRNA 遺伝子の検出が可能であり、インターナルコントロールによる偽陰性の判別も行えます。電気泳動が不要なため、迅速に結果が得られます（約 30 分）。

＊：Smart Cycler® は Cepheid 社の登録商標です。

【反応の原理】

1. PCR

PCR 法は、ごく微量の DNA を鋳型として用いて、目的の遺伝子断片のみを増幅させる技術であり、DNA の熱変性、プライマーのアニーリング、DNA ポリメラーゼによる伸長反応の 3 ステップからなる工程を 1 サイクルとし、これを繰り返すことで、短時間のうちに目的遺伝子断片を 100 万倍にまで増幅させることができます。本キットの増幅には、Hot Start PCR 用酵素、*TaKaRa Ex Taq* HS を使用していますので、反応液調製時などサイクル前のミスプライミングやプライマーダイマーに由来する非特異的増幅を防ぐことができ、高感度の検出が可能になります。

2. サイクリングプローブ法

本キットの検出には、特異性の高いサイクリングプローブ法を採用しています。
サイクリングプローブ法は、RNA と DNA からなるキメラプローブと RNase H の組み合わせによる高感度な検出方法で、増幅中や増幅後の遺伝子断片の特定配列を効率良く検出することができます。プローブは、RNA 部分をはさんで一方が蛍光物質で、もう一方がその蛍光物質の発する蛍光を消光する物質（クエンチャー）で標識されています。このプローブは、インタクトな状態ではクエンチングにより蛍光を発することはありませんが、増幅産物中の相補的な配列とハイブリッドを形成した後に RNase H により RNA 部分で切断されることにより、強い蛍光を発するようになります。（図 1 参照）この蛍光強度を測定することで、増幅産物量をモニターすることができます。

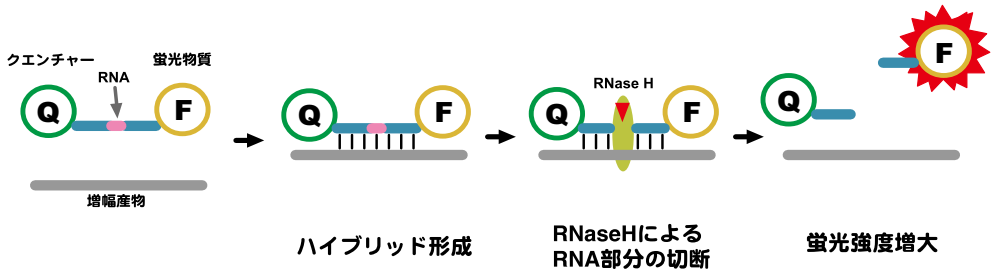


図 1. サイクリングプローブ法 の原理

I. キットの内容（25 μl 反応× 50 回分）

1. *TaKaRa Ex Taq* HS	5 units/μl	12.5 μl（50 回分）
2. Tli RNase H II＊1	200 units/μl	25 μl（50 回分）
3. 5 × Reaction Mixture ＊2	5 × conc.	250 μl（50 回分）
4. Primer Mixture		150 μl（50 回分）
5. Probe Mixture ＊3 （FAM, TET, ROX 標識）		150 μl（50 回分）
6. Mip Positive Control		10 μl（10 回分）
7. 5S Positive Control		10 μl（10 回分）
8. dH_2O		1.0 ml

＊1：Tli RNase H II は *Thermococcus litoralis* 由来の耐熱性 RNase H です。
＊2：dNTP mixture、Internal control を含みます。
＊3：蛍光標識 Probe は遮光保存に留意すること。

【プローブ標識と検出チャンネル】

ターゲット	プローブ蛍光色素	検出チャンネル	
		Smart Cycler® II System	Smart Cycler® System
mip 遺伝子	FAM および Eclipse＊クエンチャー	Ch#1	Ch#1
5S rRNA 遺伝子	ROX および Eclipse＊クエンチャー	Ch#3	Ch#4
インターナルコントロール	TET および Eclipse＊クエンチャー	Ch#2	Ch#2

＊：Eclipse は、Epoch Biosciences 社の登録商標です。

キット以外に必要な機器、試薬（主なもの）

＜検出反応に必要なもの＞

- リアルタイム PCR 用増幅装置
  Smart Cycler® System
  Smart Cycler® II System（製品コード SC200N など）
- Smart Cycler® 専用反応チューブ（製品コード SC910C など）
- Smart Cycler® 用遠心機（製品コード SC900）
- 1,000 μl、200 μl、20 μl、10 μl 各マイクロピペット
- マイクロピペット用チップ（疎水性フィルター付）

＜ DNA サンプルの調製に必要なもの＞

- フィルターホルダー（47 mm メンブレンフィルター用）
- メンブレンフィルター（直径 47 mm、孔径 0.22 μm；Millipore 社製 Code HT04700、Isopore メンブレフィルターなど）
- 濾過びん、吸引ポンプ、ピンセット
- 滅菌 50 ml コニカルチューブ
- ボルテックスミキサー
- 2.0 ml マイクロチューブ
- 微量高速冷却遠心機
- MonoFas® レジオネラ属菌ゲノム DNA 抽出キット（ジーエルサイエンス：製品コード 5010-21555）
- 特級エタノール（＞ 99%）
- ウォーターバス（70℃で使用可能なもの）
- マイクロピペット
- マイクロピペット用チップ（疎水性フィルター付）

II. 保存

－ 20℃（輸送、保存とも）

III. 使用に際して

本キットを使用する際の注意事項です。使用前に必ずお読みください。

1. 使用目的：本キットは環境分析に使用する製品です。
2. 測定結果：本キットは遺伝子検出であるため、死菌も検出されます。従って、生菌のみの検出が必要な場合は、培養法による検査も行い、結果を判定してください。
   （検査結果判定により発生する問題に関してタカラバイオ株式会社は一切の責任を負いません。）
3. 廃棄：　試料は感染性を有するものとして、各施設の安全規定に従って廃棄してください。作業区域は常に清潔に保ち、検体または検査に用いた器具等は高圧蒸気滅菌器を用いて 121℃で 20 分間以上加熱滅菌処理、または 2.5%次亜塩素酸ナトリウム液で処理を行った上、各施設の感染性廃棄処理マニュアルに従って処理してください。試薬を廃棄する際は多量の水で流してください。プラスチック、ろ紙の試薬容器ならびに器具は、廃棄物の処理および清掃に関する法律に従って処理してください。

IV. 検出可能な菌種

1. 以下のレジオネラ属菌について本製品での 5s rRNA 遺伝子の検出が可能であるか否かを確認しています。

	ID-No	Species	Serogroup	Clinical or Environmental	Designation	ATCC	本製品での検出
1	NIIB0145	*L. adelaidensis*		E	1762-AUS-E	49625	－
2	NIIB0040	*L. anisa*		E	WA-316-C3	35292	＋
3	NIIB0405	*L. beliardensis*		E	Montbe'liard A1	700512	－
4	NIIB0057	*L. birminghamensis*		C	1407-AL-H	43702	＋
5	NIIB0009	*L. bozemanii*	1	C	WIGA	33217	＋
6	NIIB0687	*L. bozemanii*	2	C	Tronto-3	35545	＋
7	NIIB0114	*L. brunensis*		E	441-1	43878	＋
8	NIIB1254	*L. busanensis*		E	KCTC 12084, K9951	700510	－
9	NIIB0047	*L. cherrii*		E	ORW	35252	＋
10	NIIB0113	*L. cincinnatiensis*		C	72-OH-H	43753	＋
11	NIIB0417	*L. donaldsonii*		C	MDA 2706	BAA-693	＋
12	NIIB0406	*L. drozanskii*		E	LLAP-1	700990	－
13	NIIB0078	*L. dumoffii*		E	NY 23	33279	＋
14	NIIB0049	*L. erythra*	1	E	SE-32A-C8	35303	＋
15	NIIB0146	*L. fairfieldensis*		E	1725-AUS-E	49588	＋
16	NIIB0408	*L. fallonii*		E	LLAP-10	700992	－
17	NIIB0688	*L. feeleii*	1	E	WO-44C	35072	＋
18	NIIB0689	*L. feeleii*	2	C	691-WI-H	35849	＋
19	NIIB0193	*L. geestiana*		E	1308	49504	（＋）
20	NIIB0234	*L. gormanii*		E	LS-13	33297	＋

	ID-No	Species	Serogroup	Clinical or Environmental	Designation	ATCC	本製品での検出
21	NIIB0147	*L. gratiana*		E	Lyon 8420412	49413	+
22	NIIB0404	*L. gresilensis*		E	Gre'oux 11D13	700509	−
23	NIIB0690	*L. hackeliae*	1	C	Lansing 2	35250	+
24	NIIB0691	*L. hackeliae*	2	C	798-PA-H	35999	+
25	NIIB0053	*L. israelensis*		E	Bercovier 4	43119	−
26	NIIB0046	*L. jamestowniensis*		E	JA-26-G1-E2	35298	+
27	NIIB0014	*L. jordanis*		E	BL-540	33623	+
28	NIIB0148	*L. lansingensis*		C	1677-MI-H	49751	+
29	NIIB0194	*L. londiniensis*	1	E	1477	49505	−
30	NIIB1255	*L. londiniensis*	2	E	Mulhouse B26	BAA-518	−
31	NIIB0692	*L. longbeachae*	1	C	Long Beach 4	33462	+
32	NIIB0693	*L. longbeachae*	2	C	Tucker 1	33484	+
33	NIIB0045	*L. maceachernii*		E	PX-1-G2-E2	35300	+
34	NIIB0008	*L. micdadei*		C	TATLOCK	33218	+
35	NIIB0116	*L. moravica*		E	316-36	43877	+
36	NIIB0195	*L. nautarum*		E	1224	49506	+
37	NIIB0036	*L. oakridgensis*		E	OR-10	33761	−
38	NIIB0042	*L. parisiensis*		E	PF-209C-C2	35299	+
39	NIIB0001	*L. pneumophila* subsp. *pneumophila*	1	C	Philadelphia-1	33152	+
40	NIIB0002	*L. pneumophila* subsp. *pneumophila*	2	C	Togus-1	33154	+
41	NIIB0003	*L. pneumophila* subsp. *pneumophila*	3	E	Bloomington-2	33155	+
42	NIIB0004	*L. pneumophila* subsp. *fraseri*	4	C	Los Angeles-1	33156	+
43	NIIB0005	*L. pneumophila* subsp. *fraseri*	5	E	Dallas 1E	33216	+
44	NIIB0150	*L. pneumophila* subsp. *pascullei*	5	E	U8W	33737	+
45	NIIB0006	*L. pneumophila* subsp. *pneumophila*	6	C	Chicago 2	33215	+
46	NIIB0033	*L. pneumophila*	7	E	Chicago 8	33823	+
47	NIIB0034	*L. pneumophila* subsp. *pneumophila*	8	C	Concord 3	35096	+
48	NIIB0304	*L. pneumophila* subsp. *pneumophila*	9	E	IN-23-G1-C2	35289	+
49	NIIB0050	*L. pneumophila* subsp. *pneumophila*	10	C	Leiden 1	43283	+
50	NIIB0051	*L. pneumophila* subsp. *pneumophila*	11	C	797-PA-H	43130	+
51	NIIB0060	*L. pneumophila* subsp. *pneumophila*	12	C	570-CO-H	43290	+
52	NIIB0061	*L. pneumophila* subsp. *pneumophila*	13	C	82A3105	43736	+
53	NIIB0062	*L. pneumophila* subsp. *pneumophila*	14	C	1169-MN-H	43703	+
54	NIIB0063	*L. pneumophila* subsp. *fraseri*	15	C	Lansing 3	35251	+
55	NIIB0451	*L. pneumophila*	untypable	E	H13-192		+
56	NIIB0453	*L. pneumophila*	untypable	E	H13-206		+
57	NIIB0462	*L. pneumophila*	untypable	E	H13-239		+
58	NIIB0196	*L. quateirensis*		E	1335	49507	+
59	NIIB0260	*L. quinlivanii*	2	E	LC870	BAA-538	+

	ID-No	Species	Serogroup	Clinical or Environmental	Designation	ATCC	本製品での検出
60	NIIB0407	*L. rowbothamii*		E	LLAP-6	700991	＋
61	NIIB0048	*L. rubrilucens*		E	WA-270A-C2	35304	＋
62	NIIB0039	*L. sainthelensi*	1	E	Mt St Helens 4	35248	＋
63	NIIB0207	*L. sainthelensi*	2	C	Ly176.97	700517	＋
64	NIIB0409	*L. santicrucis*		E	SC-63-C7	35301	＋
65	NIIB0149	*L. shakespearei*		E	214	49655	＋
66	NIIB0043	*L. spiritensis*	1	E	Mt St Helens 9	35249	－
67	NIIB0261	*L. spiritensis*	2	E	ML76	BAA-537	－
68	NIIB0041	*L. steigerwaltii*		E	SC-18-C9	35302	＋
69	NIIB0262	*L. taurinensis*		E	Turin I no 1	700508	＋
70	NIIB0117	*L. tucsonensis*		C	1087-AZ-H	49180	＋
71	NIIB0032	*L. wadsworthii*		C	81-716A	33877	＋
72	NIIB0206	*L. waltersii*		E	2074-AUS-E	51914	＋
73	NIIB0197	*L. worsleiensis*		E	1347	49508	＋
74	NIIB0305	*Legionella* genomospecies 1		E	2055-AUS-E	51913	＋
75	NIIB0306	*Legionella* sp.		E	LLAP-14	700313	－

検出＋：　10 cfu/tube 相当の DNA 量を用いた場合、陽性結果が得られたもの
検出（＋）：10 cfu/tube 相当の DNA を用いた場合は不検出、100 cfu/tube 相当以上の DNA を用いた場合で陽性結果が得られたもの
検出－：　10,000 cfu/tube 相当の DNA 量を用いた場合、不検出結果になったもの

厚生労働科学研究費補助金 地域健康危機管理研究事業「迅速・簡便な検査によるレジオネラ対策に係る公衆浴場等の衛生管理手法に関する研究」: 平成 19 年度 総括・分担研究報告書から引用

2. 以下の菌種について本製品での mip 遺伝子陽性を確認しています。

   L. pneumophila sero group 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10

3. mip 遺伝子検出系では、検体中に *L. pneumophila* が存在すると陽性になります。また、遺伝子情報から推測すると、*L. worsleiensis* や *L. fairfieldensis* が存在する場合にも陽性になる可能性があります。

4. 現在、以下の菌種などについて、クロス反応がないことを確認しています。

Serratia marcescens	*Alcaligenes faecalis*
Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae	
Staphylococcus epidermidis	
Achromobacter xylosoxidans subsp. denitrificans	
Streptcoccus pyogenes	*Pseudomonas fluorescens*
Pseudomonas aeruginosa	*Pseudomonas stutzeri*
Acinetobacter baumannii	*Acinetobacter lwoffii*
Myroides odoratus	*Escherichia coli* O157：H7
Salmonella Enteritidis	*Salmonella Agona*
Salmonella Typhimurium	*Salmonella Dublin*
Salmonella Infantis	*Salmonella Arizonae*
Citrobacter freundii	*Morganella morganii*

Staphylococcus aureus enterotoxin A, B, C, D, E, F, G, H
（human genome）

V. 操作上の注意

1. Smart Cycler® System の取り扱いは、装置の取扱説明書に従ってください。

2. 万一、キメラプローブやプライマーがヌクレアーゼの混入により分解されると、正確な検出が出来ません。実験者の汗や唾液からもヌクレアーゼが混入する可能性がありますので、操作中は細心の注意を払ってください。

3. PCR 反応は非常に感度の高い反応です。コンタミネーションを防止するために、反応液の調製から検出まで次の 3 つのエリアを設定し、物理的に隔離することを推奨します。

   ○エリア 1： 反応液の調製、分注を行います。増幅産物や、検体の入ったチューブの開閉は避けてください。
   ○エリア 2： 検体の調製を行います。増幅産物の入ったチューブの開閉は避けてください。
   ○エリア 3： 反応液への検体の添加と反応、検出を行います。増幅産物の入ったチューブの開閉は避けてください。

   本キットでは増幅反応と検出を同時にリアルタイムで行うため、反応終了後の増幅産物を電気泳動などに使用する必要はありません。コンタミネーション発生の原因となりますので、増幅産物をチューブから取り出すことはおやめください。

VI. サンプルの調製例（エリア 2 で実施）

下記は、新レジオネラ症防止指針に記載された「ろ過濃縮法」に沿ったサンプル調製の一例です。厚生省生活衛生局企画課監修　新版レジオネラ症防止指針（90 ページ）をご参照ください。

なお、リアルタイム PCR による検出は、非常に高感度です。実験環境や使用器具の汚染には極力注意を払い、コンタミネーションの防止には心がけてください。

例）可能な限り、使い捨て器具を使用する。（採水容器やフィルターホルダーなど）
使い捨てにできないものは、洗浄後、乾熱滅菌処理を施す。（ピンセットなど）
マイクロピペットは用途別に準備する。（リアルタイム PCR 試薬調製用、鋳型調製用を分ける。）

［試料の濃縮］

（1） フィルターホルダー（47 mm フィルター用）に、メンブランフィルター（直径 47 mm、孔径 0.22 μm）をセットする。
（2） 試料水 500 ml をメンブランフィルターで吸引濾過する。
（3） 吸引終了後、フィルターを滅菌ピンセットで剥がし、50 ml 滅菌コニカルチューブに入れる。
（4） チューブに滅菌蒸留水 5 ml を加え、ボルテックスミキサーで 1 分間混和する。
（5） 混和液 2 ml を 2 ml 用マイクロチューブにとる。
（6） 13,000 ～ 15,000 rpm で 4℃、5 分間遠心分離後、上清（950 μl × 2）を穏やかにマイクロピペットで吸い取って除去し、残渣液 100 μl を残す。

[DNA 抽出（MonoFas® レジオネラ属菌ゲノム DNA 抽出キットを用いた方法]

製品の取扱説明書に従って操作してください。

(1) 残渣液 100 μl に Buffer Mix*1 を 90 μl 添加し、40℃で 15 分間反応する。
(2) Proteinase K*1 を 10 μl 添加し、60℃で 1 時間反応する。
(3) 75℃で 5 分間加温、ミキサーで撹拌する。
(4) 20,000 × *g*（15,000 rpm）で 3 分間遠心し、上清を新しいチューブへ回収する。
(5) 回収した試料に Buffer AL*1 を 200 μl 添加し混合する。
(6) エタノールを 200 μl 試料に添加し、混合する。
(7) MonoFas Column for Legionella genome*1 に、試料をアプライし、2,300 × *g*（5,000 rpm）で 1 分間遠心する。
(8) Buffer AW1*1 を 300 μl 添加し、9,000 × *g*（10,000 rpm）で 1 分間遠心する。
(9) Buffer AW2*1 を 300 μl 添加し、15,000 × *g*（13,000 rpm）で 2 分間遠心する。
(10) カラムをコレクションチューブ*1 に付け替える。
(11) Buffer AE*1 を 20 μl 添加し、1 分間静置する。
(12) 15,000 × *g*（13,000 rpm）で 1 分間遠心し、DNA 溶液を回収する。
(13) 回収液のうち、5 μl を PCR に用いる。

＊ 1：MonoFas® レジオネラ属菌ゲノム DNA 抽出キットに含まれる。

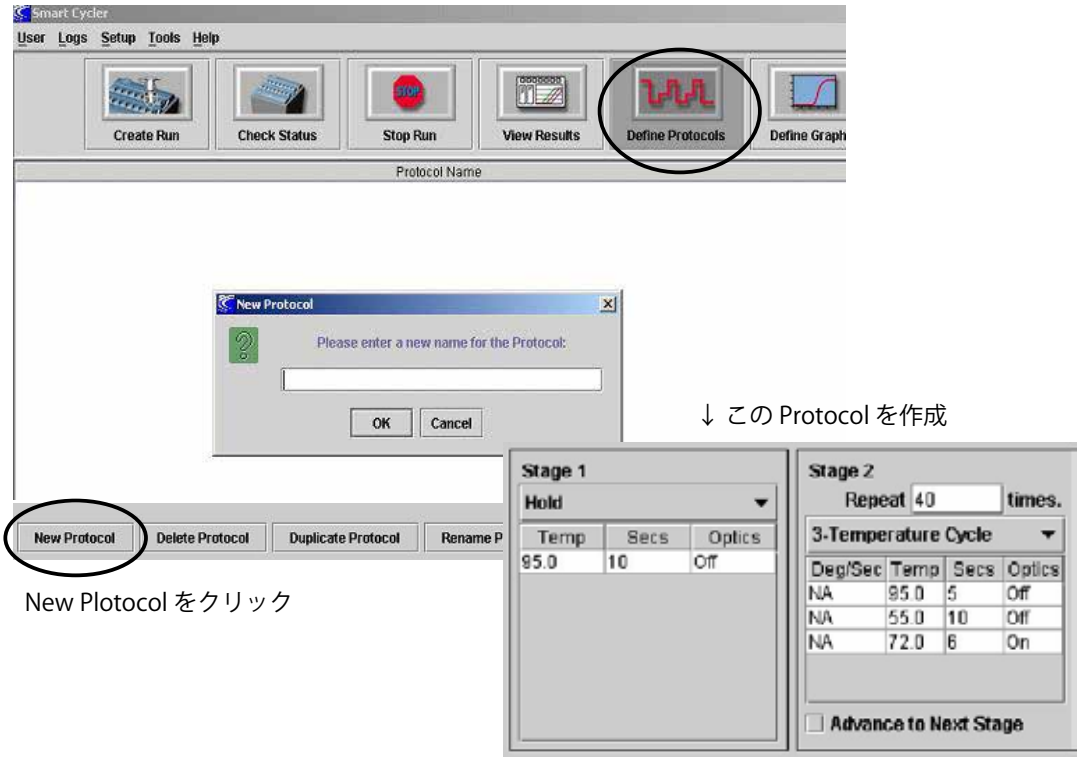
実験にあたっては、手袋、マスク、防御眼鏡を使用し、安全キャビネットあるいはクリーンベンチ内で操作してください。

VII. 操作

1. Smart Cycler® II のセッティング（エリア 3 で実施）

＊ Smart Cycler® System、Smart Cycler® II System の取り扱いについての詳細は Smart Cycler® に添付の取り扱い説明書を参照してください。
＊ Smart Cycler® System を使用する場合は、Ch#1、Ch#2、Ch#4 を使用します。Manual Thresh Fluor.Units を 100 に設定して反応を行い、16 ～ 17 ページの判定結果表を参照して判定を行ってください。

（1）Smart Cycler® II を起動する。
（2）Protocol の設定
Define Protocols のアイコンをクリックし New Protocol ボタンをクリックして以下の設定で Protocol を作成する。（作成した Protocol は保存されるので、2 回目以降の反応では入力不要）

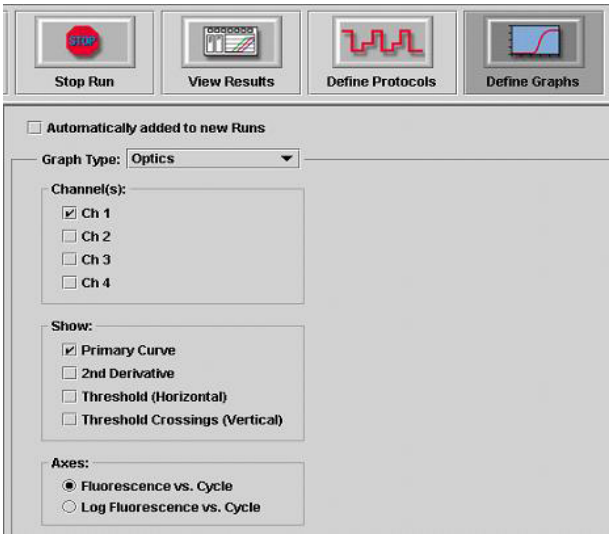


↓ この Protocol を作成

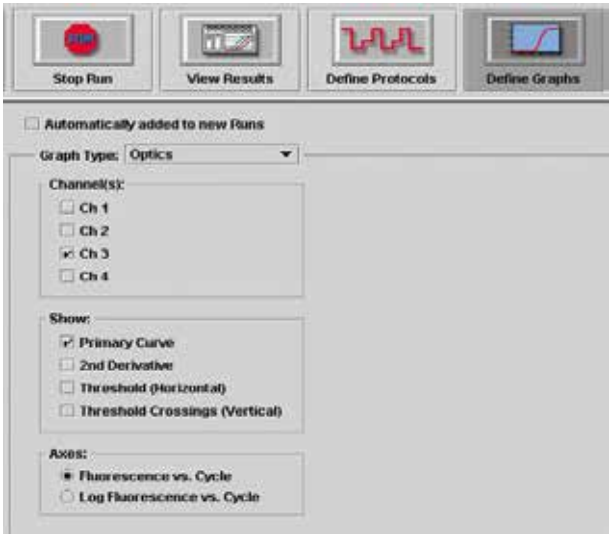
New Plotocol をクリック

（3）Graph の設定
（作成した Graph は保存されるので、2 回目以降の反応では入力不要）

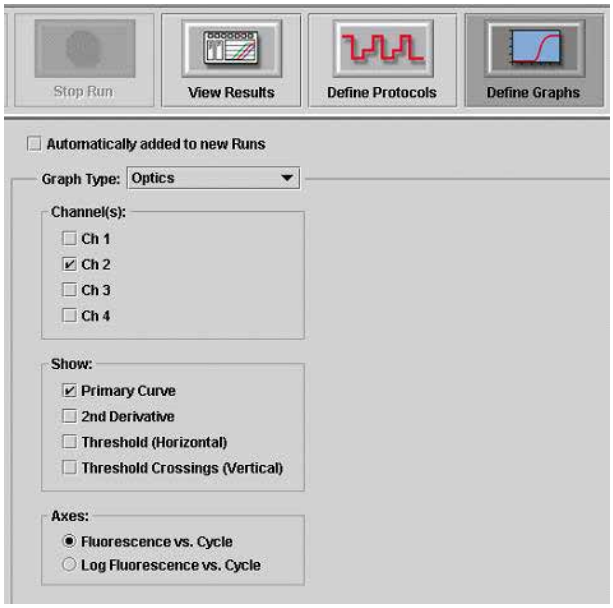
（3）-1.　mip 遺伝子検出用増幅曲線 channel 1（FAM）の設定
Define Graphs のアイコンをクリックし、以下の設定でグラフを作成する。
最後に「Save Graph」をクリックして、設定を保存する。
（初期設定では FAM というグラフ名で設定済。改めて作成する必要は無い。）



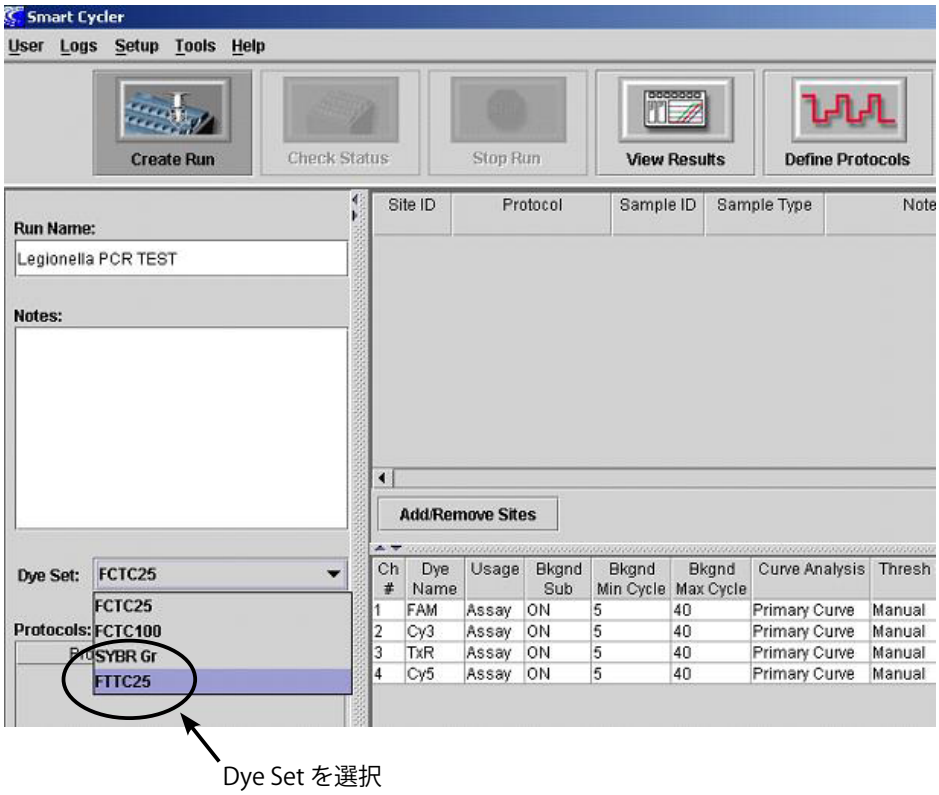
（3）-2.　5S rRNA 遺伝子検出用増幅曲線 channel 3（Texas Red）の設定
ROX は、Texas Red と同じ channel（Ch#3）で解析する。
（初期設定では Texas Red というグラフ名で設定済。改めて作成する必要は無い。）



（3）-3.　インターナルコントロール検出用増幅曲線 channel 2（TET）の設定
（初期設定では TET というグラフ名で設定済。改めて作成する必要は無い。）

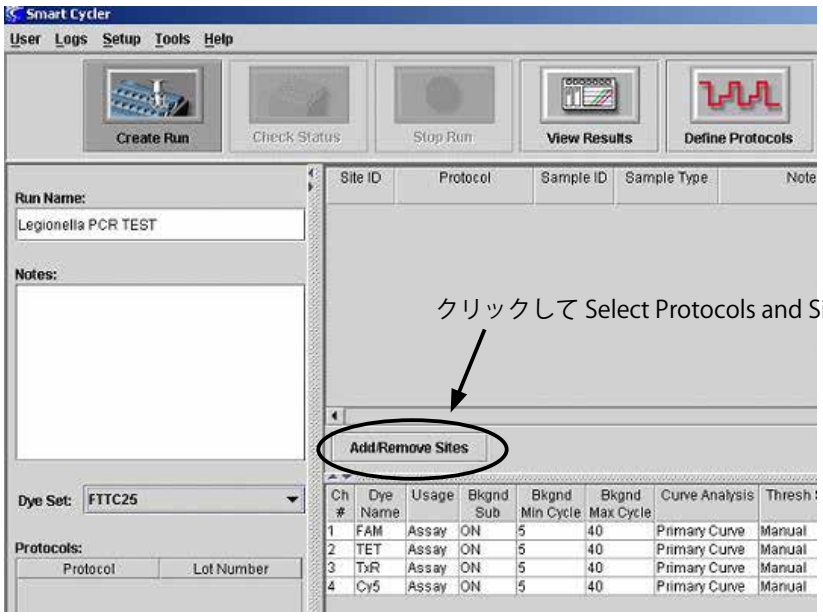


（4）Create Run のアイコンをクリックし、Run Name を入力、Dye Set を選択（FTTC25）する。

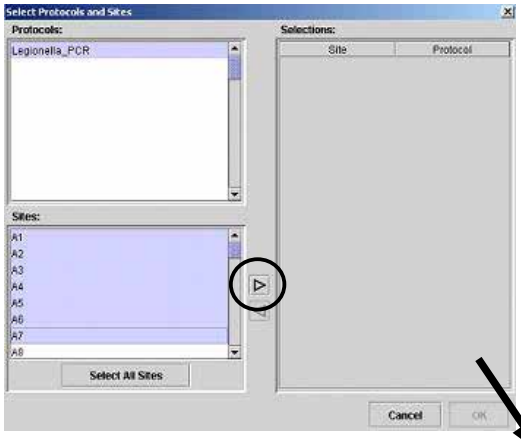


Dye Set を選択

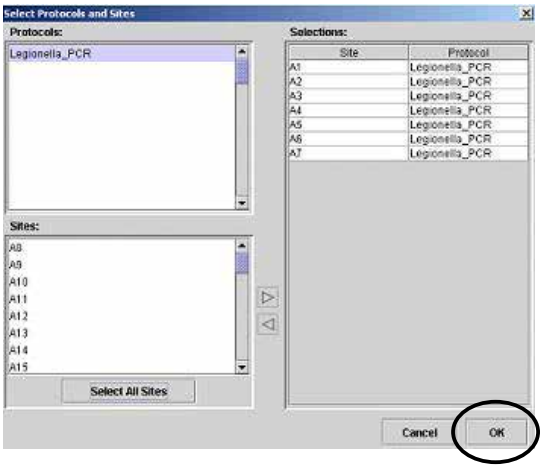
（5） Add/Remove Sites ボタンをクリックし、Select Protocols and Sites スクリーンを表示させ、使用する Site と Protocol を選択し、OK ボタンを押す。



クリックして Select Protocols and Sites 画面を表示



使用する Site と Protocol を選択し
"OK" ボタンをクリック



2. PCR 反応液の調製（エリア 1 で実施）

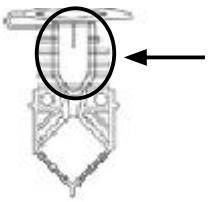
正しい検出結果を得るために、サンプルのかわりに滅菌蒸留水を加えたネガティブコントロール反応、Mip Positive Control および 5S Positive Control を加えたポジティブコントロール反応を設定します。通常、Mip Positive Control と 5S Positive Control を両方とも 1 本のチューブに添加して Positive Control 反応を行います。

下記に示す反応液を氷上で調製する。（エリア 1 で実施）
サンプル（鋳型）以外のコンポーネントを必要本数＋α分調製し、専用チューブに分注する。

	液量（1 反応）	
5 × Reaction Mixture	5 μl	
Primer Mixture	3 μl	
Probe Mixture	3 μl	
TaKaRa Ex Taq HS（5 U/μl）	0.25 μl	
Tli RNase H II（200 U/μl）	0.5 μl	
サンプル（鋳型）または Positive Control または滅菌水	5 μl	（← エリア 3 で添加）
dH_2O	8.25 μl	
	25 μl	

＊ ポジティブコントロール反応では、サンプル（鋳型）のかわりに Positive Control を各 1 μl（計 2 μl）と滅菌蒸留水 3 μl を添加する。また、ネガティブコントロール反応では、サンプル（鋳型）のかわりに滅菌蒸留水 5 μl を添加する。

サンプル（鋳型）以外のコンポーネント（20 μl）を下記の矢印の部分に（側面に沿わせるように）分注する。

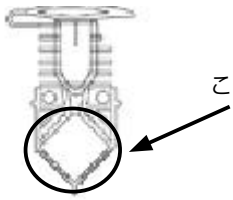


チューブキャップが引っかかる程度に軽くふたをしてエリア 3 に移動する。

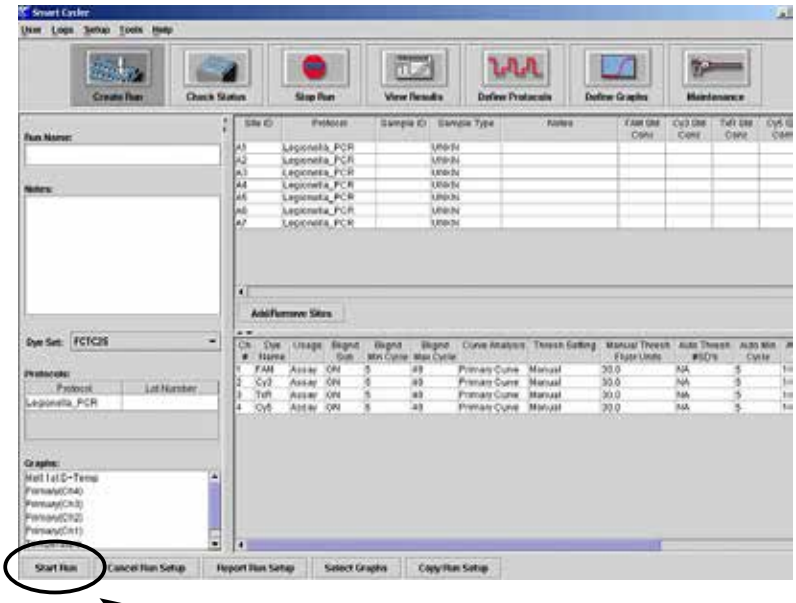
3. サンプル（鋳型）の添加（エリア 3 で実施）

ネガティブコントロールとして、サンプルの代わりに滅菌蒸留水を加えたものを 1 本調製後、残りのチューブについて、2 で分注した調製液部分にサンプルや Positive Control を添加し、しっかりふたをする。

4. PCR 反応、検出（エリア 3 で実施）
専用遠心機で遠心を行い、チューブ下部のひし形部分に反応液を落とす。



反応チューブを Smart Cycler® にセットし、Start Run ボタンをクリックして反応を開始する。



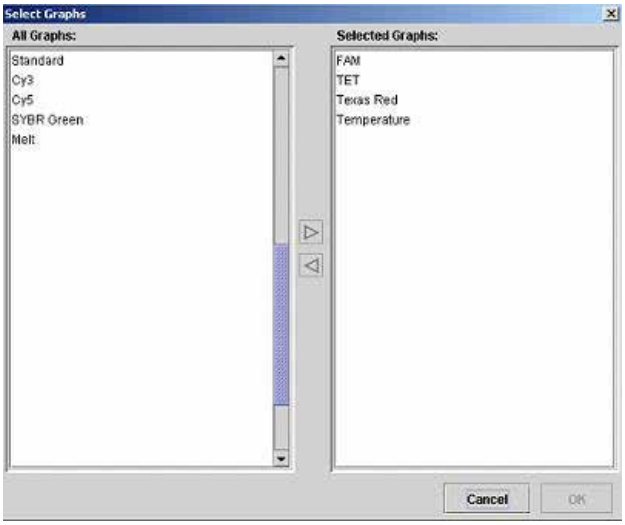
Start Run をクリックする

5. 結果表示

（1） View Results 画面を表示する。（反応をスタートすると自動的に View Results 画面が表示される。別の画面が表示されている場合は View Results アイコンをクリックする。）

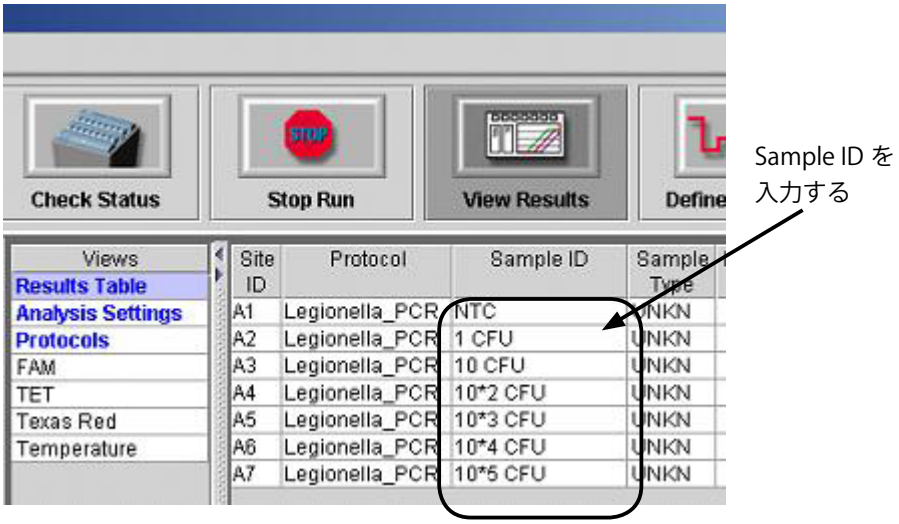
（2） Select Graphs ボタンをクリックし、Select Graphs スクリーンを表示して FAM（mip 遺伝子由来の増幅曲線）、TxR（5S rRNA 遺伝子由来の増幅曲線）、TET（インターナルコントロール由来の増幅曲線）および Temperature（温度チャート表示グラフ）を選択する。

クリックして Select Graphs スクリーンを表示



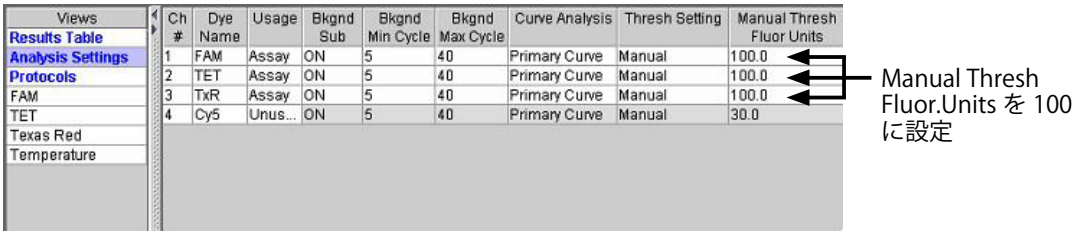
※ FAM、TET、Texas Red、Temperature のグラフが初期設定で選択されている場合は、設定し直す必要はない。

(3) Views リストの Results Table をクリックして表示し、Sample ID を入力する。



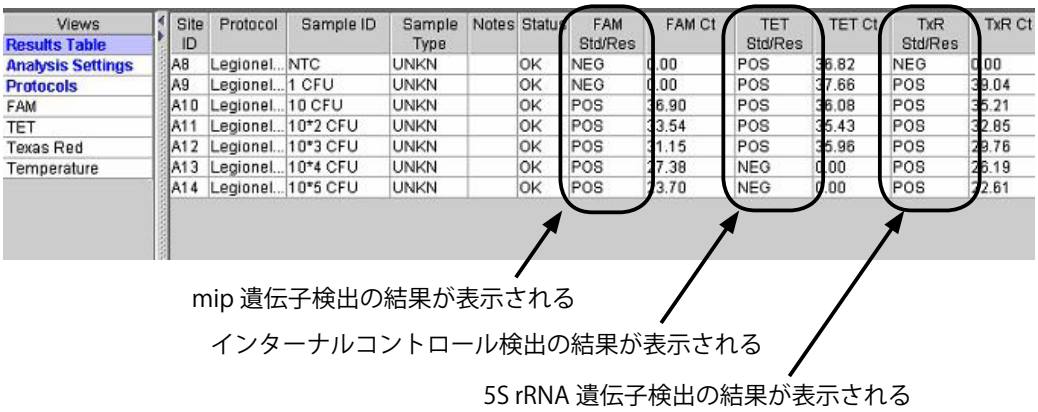
(4) Analysis Settings をクリックして表示し、Ch#4 の Usage をクリックして、プルダウンメニューより Unused を選択する。(この設定が有効後は、使用しない Ch のデータは Results Table で非表示になる。) なお、Ch#1, 2, 3 についての設定は Assay のままにしておく。

(5) Analysis Settings で、Ch#1, 2, 3 の Manual Thresh Fluor.Units を 100 に設定する。
これが Cut Off 値となる。(セルに数値を入力後、画面の Update Analysis ボタンをクリックすると設定が有効になる。)



(6) Views で FAM を選択し、mip 遺伝子由来の増幅曲線をリアルタイムでモニタリングする。
(7) Views で Texas Red を選択し、5S rRNA 遺伝子由来の増幅曲線をリアルタイムでモニタリングする。
(8) Views で TET を選択し、インターナルコントロール由来の増幅曲線をリアルタイムでモニタリングする。

（9） 反応終了後、Results Table をクリックして表示し、FAM Std/Res（Standard/Results）、TxR Std/Res、TET Std/Res の列を見て検出結果を確認する。mip 遺伝子の増幅産物由来の蛍光シグナル値が 100 以上の場合は FAM Std/Res の列に POS と表示され、100 未満の場合は NEG と表示される。同様に、5S rRNA 遺伝子の結果は TxR Std/Res に、インターナルコントロールの結果は TET Std/Res に表示される。


Views
Results Table
Analysis Settings
Protocols
FAM
TET
Texas Red
Temperature
Site ID
Protocol
Sample ID
Sample Type
Notes
Status
FAM Std/Res
FAM Ct
TET Std/Res
TET Ct
TxR Std/Res
TxR Ct
A8 Legionel... NTC UNKN OK NEG 0.00 POS 36.82 NEG 0.00
A9 Legionel... 1 CFU UNKN OK NEG 0.00 POS 37.66 POS 39.04
A10 Legionel... 10 CFU UNKN OK POS 36.90 POS 36.08 POS 35.21
A11 Legionel... 10*2 CFU UNKN OK POS 33.54 POS 35.43 POS 32.85
A12 Legionel... 10*3 CFU UNKN OK POS 31.15 POS 35.96 POS 29.76
A13 Legionel... 10*4 CFU UNKN OK POS 27.38 NEG 0.00 POS 26.19
A14 Legionel... 10*5 CFU UNKN OK POS 23.70 NEG 0.00 POS 22.61
mip 遺伝子検出の結果が表示される
インターナルコントロール検出の結果が表示される
5S rRNA 遺伝子検出の結果が表示される

＊「FAM Std/Res」、「TxR Std/Res」の列に「POS」、「NEG」と表示されずに数値が表示されてしまう場合は 21 ページの X. トラブルシューティング（1）を参照。

VIII. 判定

反応中に、mip 遺伝子由来の蛍光シグナル値（FAM）が 100 以上を示した場合、Results Tables の FAM Std/Res に「POS」と表示され、100 以下の場合は「NEG」と表示される。同様に、5S rRNA 遺伝子由来の蛍光シグナル値の場合は TxR Std/Res、インターナルコントロール由来の蛍光シグナル値の場合は TET Std/Res に表示される。これらの表示結果より、次ページの判定結果表を参照し、判定を行う。

（注意） 増幅産物以外のシグナルノイズなどにより過って「FAM Std/Res」や「TxR Std/Res」が「POS」と表示される場合がある。増幅曲線の形状を見てシグモイドを描いていない場合は注意が必要である。
→ 21 ページの X. トラブルシューティング（2）を参照。

判定結果表

判定結果表 1：サンプルを添加した場合（各コントロール反応の結果とあわせて最終判断を行うこと）

		TET Std/Res（インターナルコントロール）	
		POS	NEG
FAM Std/Res（mip）	POS	mip 遺伝子陽性＊1 （検体中に *L. pneumophila* が存在する）	mip 遺伝子陽性＊1 （検体中に *L. pneumophila* が存在する）
	NEG	mip 遺伝子検出限界以下＊2 （検体中に *L. pneumophila* が検出限界以下）	判定不能＊3
TxR Std/Res（5S）	POS	5S rRNA 遺伝子陽性＊1 （検体中に *Legionella* 属細菌が存在する）	5S rRNA 遺伝子陽性＊1 （検体中に *Legionella* 属細菌が存在する）
	NEG	5S rRNA 遺伝子検出限界以下＊2 （検体中に *Legionella* 属細菌が検出限界以下）	判定不能＊3

判定結果表 2：ポジティブコントロール反応（サンプルのかわりに Mip および 5S Positive Control を添加したもの）

		TET Std/Res（インターナルコントロール）	
		POS	NEG
FAM Std/Res（mip）	POS	mip 遺伝子検出系に問題なし	mip 遺伝子検出系に問題なし
	NEG	mip 遺伝子検出系に問題あり＊4	判定不能＊3
TxR Std/Res（5S）	POS	5S rRNA 遺伝子検出系に問題なし	5S rRNA 遺伝子検出系に問題なし
	NEG	5S rRNA 遺伝子検出系に問題あり＊4	判定不能＊3

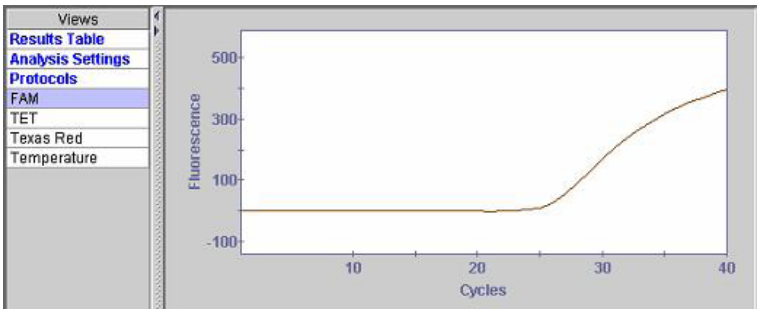
判定結果表 3：ネガティブコントロール反応（サンプルのかわりに滅菌蒸留水を添加したもの）

		TET Std/Res（インターナルコントロール）	
		POS	NEG
FAM Std/Res（mip）	POS	mip 遺伝子コンタミネーションの疑い＊5	mip 遺伝子コンタミネーションの疑い＊5
	NEG	mip 遺伝子コンタミネーションなし＊2	判定不能＊3
TxR Std/Res（5S）	POS	5S rRNA 遺伝子コンタミネーションの疑い＊5	5S rRNA 遺伝子コンタミネーションの疑い＊5
	NEG	5S rRNA 遺伝子コンタミネーションなし＊2	判定不能＊3

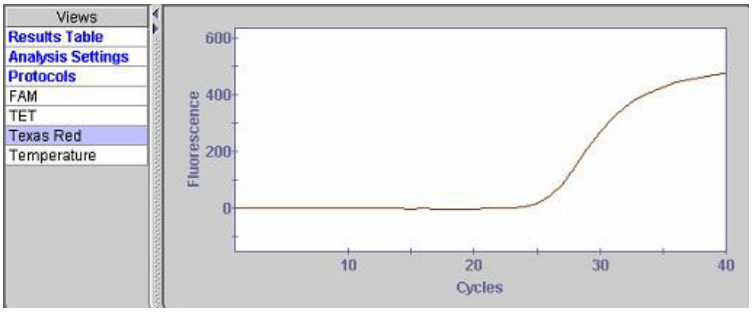
＊1：インターナルコントロールの POS/NEG に関わらず、mip あるいは 5S rRNA 遺伝子が陽性である。（検体中に *L. pneumophila* が存在する、あるいは *Legionella* 属細菌が存在する。）ネガティブコントロール反応の結果から反応系にコンタミネーションがなかったことを確認すること。
＊2：ポジティブコントロールの反応で POS となる（反応系に問題がない）ことを確認すること。
＊3：何らかの原因で PCR 反応またはサイクリングプローブ検出が正常に行われていない。再反応を行う。サンプル中に反応阻害物質が含まれている可能性もあるので、場合によっては検体の再調製が必要。
＊4：プライマーあるいはプローブに問題があるか、ポジティブコントロールが分解している。
＊5：コンタミネーションの疑いがある場合は、反応液の調製場所および使用する機器を除染したうえで再反応を行う。

（例）Mip Positive Control および 5S Positive Control を添加した反応の場合

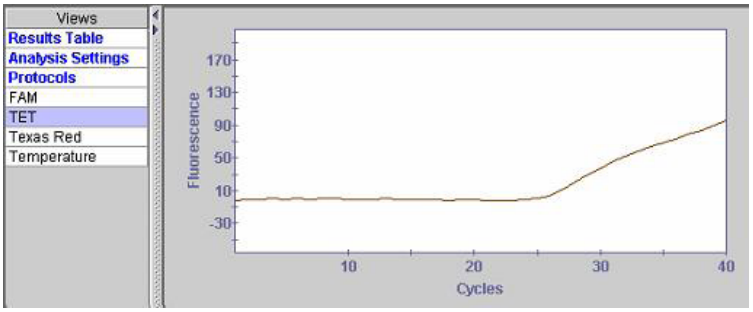
Ch #1：mip 遺伝子由来増幅曲線（FAM）



Ch #3：5S rRNA 遺伝子由来増幅曲線（Texas Red）



Ch #2：インターナルコントロール由来増幅曲線（TET）



IX. 備考

CFU 値が既知であるサンプルを段階希釈し、測定結果から検量線を作成することもできます。
（大阪市立環境科学研究所 石井 営次 先生に御協力頂きました。）

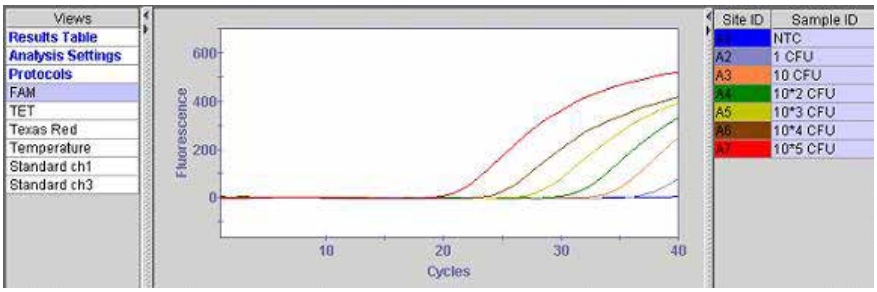
【*L. pneumophila* をサンプルとした場合の例】

1. *L. pneumophila* サンプルの希釈
   菌体熱抽出液を、順次 10 倍希釈して 0.5 CFU ～ 5 × 10^4 CFU 相当 / μl の 6 段階濃度に調製した。
   反応は、これらのサンプルを 2 μl ずつ用いた。

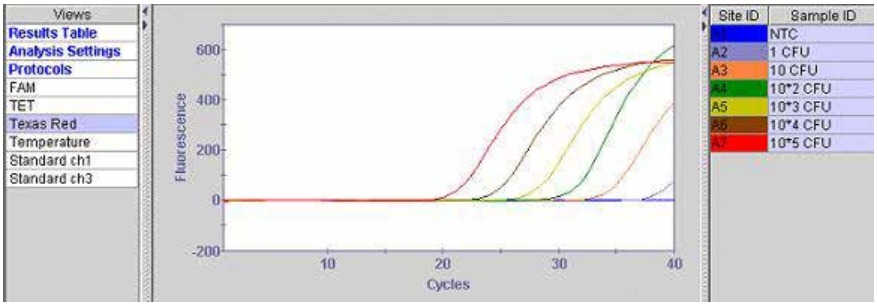
2. 反応液の調製と反応
   「VII. 操作」に記載されている方法に従って、PCR 反応を行った。サンプルの代わりに dH_2O を用いた Negative Control 反応も同時に調製した。

3. 増幅曲線のリアルタイムモニタリング
   PCR 産物の増幅を、リアルタイムでモニタリングした。（FAM, TxR, TET）

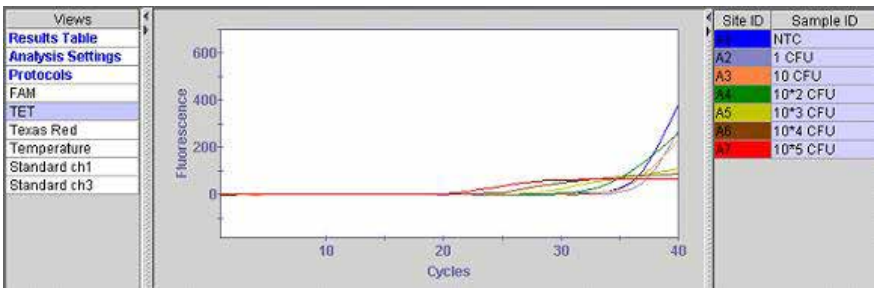
   mip 遺伝子由来増幅曲線（FAM）



   5S rRNA 遺伝子由来増幅曲線（TxR）

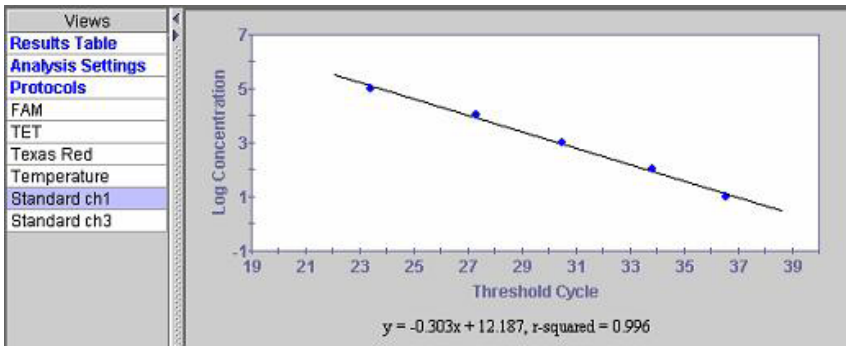


   インターナルコントロール由来増幅曲線（TET）

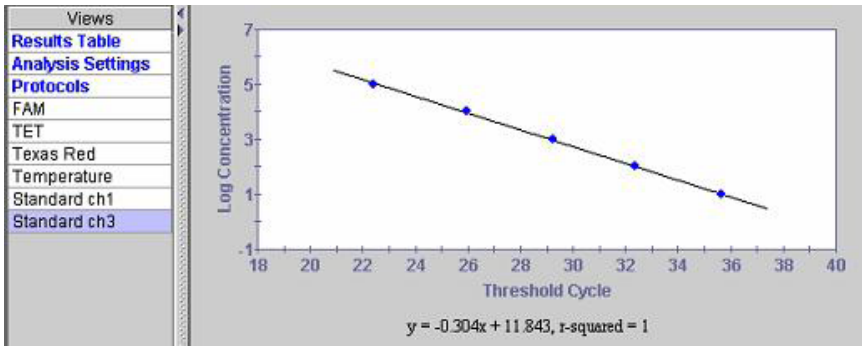


4. 検量線の作成
反応終了後、増幅曲線から Ct 値を求め、検量線を作成した。

mip 遺伝子検量線（FAM）



5S rRNA 遺伝子検量線（Texas Red）

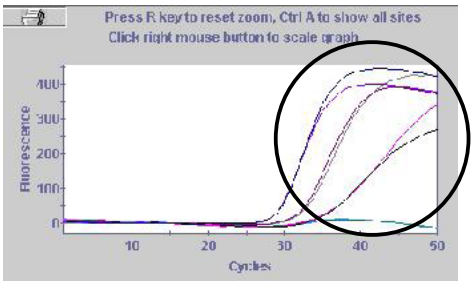


L. pneumophila は、鋳型として 10 CFU 相当の菌体を用いた場合まで検出可能でした。検量線の直線性は非常に高く、実験した範囲内で正確な定量が可能だと考えられます。

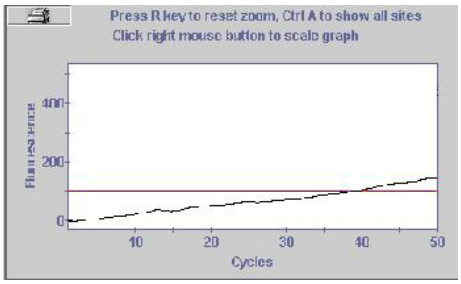
X. トラブルシューティング

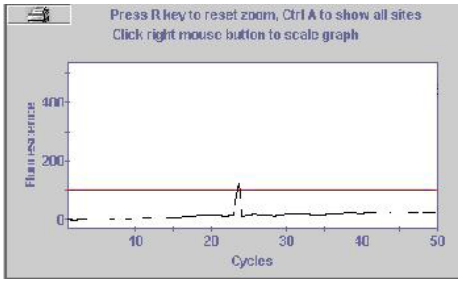
（1）【トラブル】FAM, TET, または TxR Std/Res の表示が POS または NEG と表示されずに、数値が表示される。
【対策】 "Result Table" の "Sample Type" が STD に設定されていると数値表示になります。"Sample Type" の列はすべて UNKN にしてください。

（2）【トラブル】増幅産物以外のシグナルノイズ等により、誤って POS と表示されてしまう。
【対策】 増幅曲線を見て判断します。結果が紛らわしい場合は、再反応を行ってください。



増幅産物由来のシグナル上昇
（シグモイド曲線を描く）





増幅曲線以外のシグナル上昇

（3）【トラブル】増幅曲線を表示したとき検出された蛍光シグナルが弱く、そのシグナル値にグラフの Y 軸スケールが自動的に調整されてしまい、バックグラウンドが高く見えてしまう。
【対策】 Y 軸スケールを手動で調整します。

【Smart Cycler® System の場合】
1）Y 軸の目盛り付近をマウスで右クリックし、"Axes Graph Scale" スクリーンを表示する。
2）"y Axis (Fl.)" の Max 値に適当な数値（例：陽性コントロール反応時の Y 軸値）
3）"Exit" ボタンをクリックして、"Axes Graph Scale" スクリーンを閉じる。

【Smart Cycler® II System の場合】
1）Y 軸の目盛り付近をマウスで左クリックしてポップアップメニューより "Scale graph" を選択し、"Axes Graph Scale" スクリーンを表示する。
2）"y Axis (Fl.)" の Max に適当な数値（例：陽性コントロール反応時の Y 軸値）を入力し、"Apply" ボタンをクリックする。
3）"Exit" ボタンをクリックして、"Axes Graph Scale" スクリーンを閉じる。

＊反応中はスケール調整ができません。全ての反応の終了後に行ってください。

XI. 参考文献

1）Fields, B.S., Benson, R.F., Besser, R.E. : Legionella and Legionnaires' disease : 25 years of investigation. *Clin. Microbiol. Rev.*, **15** : 506-526, 2002.
2）Benin, A.L., Benson, R.F., Besser, R.E. : Trends in legionnaires disease, 1980-1988 : declining mortality and new patterns of diagnosis. *Clin. Infect. Dis*., **35** : 1039-1046, 2002.
3）厚生省生活衛生局企画課（監修）：新版レジオネラ症防止指針 . 財団法人ビル管理教育センター , 1999.
4）厚生労働科学研究費補助金地域健康危機管理研究事業「迅速・簡便な検査によるレジオネラ対策に係る公衆浴場等の衛生管理手法に関する研究」：平成 19 年度 総括・分担研究報告書

XII. 関連製品

Smart Cycler® II System（製品コード SC200N）
Cycleave®PCR *Legionella* (5S rRNA) Detection Kit Ver. 2.0（製品コード CY210）
Cycleave®PCR O-157(VT1/VT2) Typing Kit（製品コード CY222）
Cycleave®PCR 肉種判別キット (6 種)（製品コード CY218）
Cycleave®PCR *Salmonella* Detection Kit Ver. 2.0（製品コード CY205）

XIII. 注意

- 本製品は食品分析および環境分析用試薬です。ヒト、動物への医療、臨床診断には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。検査結果判定により発生する問題に関してタカラバイオ株式会社は一切の責任を負いません。
- タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- ライセンスに関する最新の情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
- 本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

ご注意

本製品は、Epoch Biosciences, Inc. のクエンチャーのライセンスを受け、製造・販売されています。
本製品は、生命科学研究分野、食品検査を含む工業的検査分野、環境分析、法医学や動物診断における検出用です。また、これらの分野において、第三者に検出サービスを提供するために、本製品を商業目的で使用することができます。
ヒトの医療、治療、診断や動物の医療、治療、およびバイオテロに関連する分析、患者の処置あるいは治療方法を選択するための用途には使用できません。
本製品は、Epoch Biosciences, Inc. 保有の特許（US20020155484, WO0142505, WO02099141, US10/113,445, US09/876,830）のライセンスのもと製造・販売されており、本製品と関連技術に関する権利は、上記特許の及ぶ範囲において Epoch Biosciences, Inc. に属します。下記注にある商業用途のライセンスは包含されていませんので、当該商業目的の使用には、Epoch Biosciences, Inc. からの別途ライセンスが必要です。

（注）別途ライセンスが必要な商業用途には以下の用途を含みます。
A：本製品、あるいは本製品により派生するものを販売・リース・ライセンス・その他の方法で第三者に引き渡すこと。
B：本製品、あるいは本製品により派生するものの使用権につき、第三者にリース・ライセンス・その他の権利付与をおこなうこと。
C：本製品を含有するキットを販売・リース・ライセンス・その他の方法で第三者に引き渡すこと。

ライセンスについてお問い合わせ先：
タカラバイオ株式会社
Tel　077-543-6116　Fax　077-543-1977
ホームページアドレス http://www.takara-bio.co.jp/

[L4] Quencher
This product is for measurement of amplification detection for research use only in life sciences research, industrial and environmental testing (including food industry, but excluding bio-terrorism and bio-warfare), non-human animal diagnostic testing, forensic testing and providing services to third parties who do not use the services for the purpose of (a) providing patient management or care, and in which the results of such services are not included in patient records and (b) providing bio-terrorism or bio-warfare testing; and specifically excluding, without limitation: (I) any human clinical, therapeutic or diagnostic uses and animal clinical and therapeutic uses (including any use of the results of any testing performed with any product for patient management or care, or the use of the results of the services for patient management or care) and (II) any research or services where the results of any test or assay are used for patient management, care or otherwise in making therapeutic or treatment decisions for a patient.
A portion of this product is subject to proprietary rights of Epoch Biosciences, Inc. and are made and sold under license from Epoch Biosciences, Inc. under the patents and patent applications (US20020155484, WO0142505, WO02099141, US10/113,445, US09/876,830 and corresponding patents issued in other countries).
There is no implied license for commercial use with respect to this product. A license must be obtained directly from Epoch Biosciences, Inc. with respect to any proposed commercial use of this product, and "commercial use" includes but is not limited to (A) the sale, lease, license or other transfer of this product or any material derived or produced from it, (B) the sale, lease, license or other grant of rights to use this product or any material derived or produced from it, and (C) the sale, lease, license or other transfer of kits which include this product.

[L15] Hot Start PCR
Licensed under U.S. Patent No. 5.338,671 and 5,587,287, and corresponding patents in other countries.

[M40] Thermostable RNase H
This product is covered by the claims of U.S. Patent No. 7,422,888 and its foreign counterpart patent claims.

[M46] PCR-Cycleave
This product is covered by the claims of Japanese Patent No. 4022522.

[M57] LA Technology
This product is covered by the claims 6-16 outside the U.S. corresponding to the expired U.S. Patent No. 5,436,149.

製品についての技術的なお問い合わせ先
TaKaRa テクニカルサポートライン
Tel 077-543-6116　Fax 077-543-1977
ホームページアドレス http://www.takara-bio.co.jp/

タカラバイオ株式会社

v201308